

Analyse von *Legionella pneumophila* in Aerosolen aus Verdunstungskühlanlagen mittels einer flussbasierten Microarray-Plattform

Lena Heining¹, Laura Welp², Achim Hugo² und Michael Seidel¹

¹Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie, TU München, Garching, Deutschland

²Institut für Energie- und Umwelttechnik, Duisburg, Deutschland

Kontakt: lena.heining@tum.de

Einleitung

Immer wieder kam es in den letzten Jahren zu Ausbrüchen von Legionellen, was letztendlich auf kontaminierte Verdunstungskühlanlagen (s. Abb. 1) zurückgeführt werden konnte [1]. Die 42. BImSchV sieht zwar eine regelmäßige Überwachung des Kühlwassers vor, jedoch besteht die Gefahr für eine Erkrankung vor allem durch austretende Aerosole. Sind diese mit *Legionella pneumophila* kontaminiert, kann eine Inhalation zur Legionärskrankheit, einer Pneumonie-ähnlichen Erkrankung, führen. Je nach Wetterbedingungen können *L. pneumophila* in Aerosolen mehrere Kilometer weit transportiert werden [2].



Abb. 1: Verdunstungskühlanlage

Deshalb ist es wichtig, Informationen über die Verteilung dieser Bakterien zwischen Wasser- und Luftphase zu erhalten, da ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration an Bakterien im Wasser und in der Luft nicht erwiesen ist.

Ein weiteres Problem ist der Übergang von *L. pneumophila* in den sogenannten „viable but not culturable“ (VBNC) Status. Dadurch sind die Bakterien zwar lebensfähig und pathogen, aber nicht mehr kultivierbar, was bei einer Analyse durch Kultivierung zu einer Unterbestimmung führen kann. Ein weiterer Nachteil der Verwendung der Kultivierung als Standardmethode stellt die sehr lange Analysendauer von 7-10 Tage dar. Besonders bei akuter Gefährdung ist ein schnelles Messergebnis nötig, um zeitnah geeignete Maßnahmen ergreifen zu können.

Durch einen Antikörper-basierten Microarray-Immunoassay auf dem Microarray Chip Reader (MCR) Le-

gioTyper ist nicht nur ein schnelles Messergebnis innerhalb von 30 Minuten möglich, sondern auch gleichzeitig eine Sero- und Subtypisierung. Neben der Analyse des Prozesswassers sollte zukünftig für ein umfassendes Umweltmonitoring auch die Immission und Emission von *L. pneumophila* mittels Immunoassay untersucht werden können. Die Antikörper-basierte Schnellanalyse von Bioaerosolen kann einen wichtigen Beitrag für ein verbessertes Ausbruchmanagement und Risikobewertung von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen liefern.

Methoden und Materialien

Für die Erzeugung von pathogenen Bioaerosolen ist ein Arbeitsplatz ohne Risiko einer Exposition nötig. Deswegen wird die Generation und Sammlung der Bioaerosole in einer Bioaerosolkammer durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine zur Biosicherheitsbank umgebauten Glove-Box (s. Abb. 2) [3].

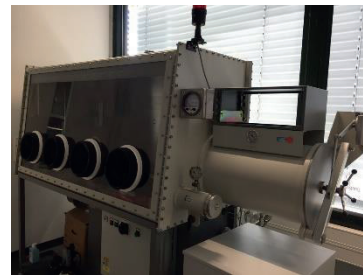


Abb. 2: Bioaerosolkammer

Die Aerosolerzeugung findet mit dem Pari LC Plus Nebulizer mit Pari Boy Kompressor statt.

Die Sammlung erfolgt über 10 Minuten mit dem Zyklonsammler Coriolis μ (s. Abb. 3) bei einer Flussrate von 300 L/min und mit 10 mL Ringerlösung als Sammelflüssigkeit.



Abb. 3: Zyklonsammler Coriolis µ

Anschließend wird ein Chemilumineszenz Sandwich-Microarray-Immunoassay (CL-SMIA) auf einer automatisierten Microarray-Analyseplattform (MCR) LegioTyper (s. Abb. 4) durchgeführt.



Abb. 4: Neueste Version der Analyseplattform MCR

Es wird ein definiertes Panel an Fängerantikörpern verwendet, an die *L. pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 mit unterschiedlicher Affinität bindet. Die Antikörper sind dabei auf einem Polycarbonat-Microarraychip, bei welchem die Oberfläche mit Carboxy-modifiziertem Jeffamine beschichtet ist, aufgetragen. Nach Injektion der Probe und Bindung der Legionellen erfolgt die automatisierte Zugabe eines Detektionsantikörpers gegen *L. pneumophila*, anschließend die der Reagenzien für die Chemilumineszenzreaktion, die mit einer CCD-Kamera detektiert wird.

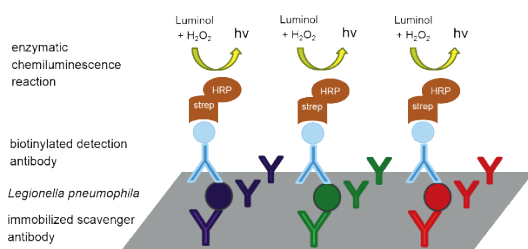


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus des Chemilumineszenz Sandwich-Microarray-Immunoassays (CL-SMIA)

In Ergänzung erfolgt eine quantitative Analyse auf einem Durchflusszytometer von rqmicro (s. Abb. 6). Mit

diesem Analysegerät ist eine Bestimmung der Zellkonzentrationen von lebenden und toten Legionellen möglich. Verwendet wird ein Reagenzienkit, bei dem ein Panel an Antikörpern gegen *L. pneumophila* Sg 1-15 auf magnetischen Mikropartikeln immobilisiert wird. In Zusammenhang mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern ist eine quantitative Sammeleffizienz des Coriolis µ bezogen auf den Anteil an intakten und nicht-intakten Bakterienzellen möglich.



Abb. 6: Durchflusszytometer rqmicro.COUNT

Ergebnisse

Subtypisierung am LegioTyper

In Abb. 7 ist die Kameraaufnahme der Chemilumineszenz-Signale des CL-SMIA zu sehen.

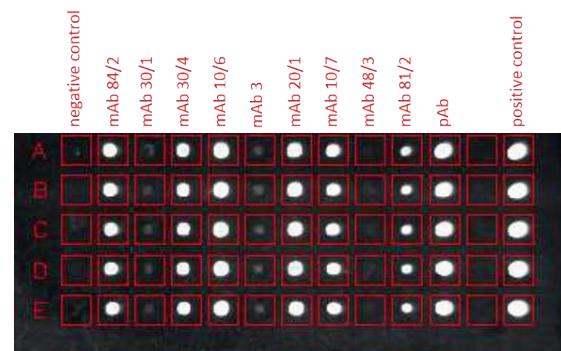


Abb. 7: Kameraaufnahme der Chemilumineszenz-Signale des CL-SMIA für *Legionella pneumophila* Sg 1 Subtyp Bellingham bei einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL. Verwendete Antikörper sind oberhalb in roter Schrift angegeben.

Der polyklonale Antikörper pAb zeigte ein Signal bei der Anwesenheit von *L. pneumophila* Sg 1, während durch die Zusammensetzung der positiven Signale bei den neun monoklonalen Antikörpern auf den jeweiligen Subtyp geschlossen werden kann. Im Falle des hier verwendeten Subtypen Bellingham sind positive Signale für die Antikörper mAb 84/2, mAb 30/4, mAb 10/6, mAb 20/1, mAb 10/7 zu erwarten und auch zu erkennen. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit

des Systems wird bei jeder Messung eine Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt.

Konzentrationsbestimmung mit der rqmicro-Methode

Da der CL-SMIA bisher nur qualitative Ergebnisse liefert, wurde zusätzlich eine quantitative Analyse der gesammelten Bioaerosole mittels Durchflusszytometrie von rqmicro durchgeführt.

Dazu wurde sowohl die Gesamtzahl an *L. pneumophila* Sg 1-15 (total legionella concentration (TLC)), als auch die Anzahl der intakten *L. pneumophila* Sg 1-15 (intact legionella concentration (ILC)) mit einer Auftragung von grüner Fluoreszenz gegen rote Fluoreszenz bestimmt. Durch Vergleich der ILC-Ergebnisse vor und nach dem Sammeln, konnte erkannt werden, dass eine Abnahme der lebenden Legionellen von $2,30 \times 10^7$ ILC/mL auf $1,67 \times 10^7$ ILC/mL (mit Berücksichtigung Verdünnungsfaktor durch Sammel-flüssigkeit) auftrat. Dies kann durch Stressfaktoren beim Sammeln begründet werden.

Durch Einbezug der TLC konnte die Überlebensrate beim Sammeln der Legionellen in Aerosolen berechnet werden. Dazu wurde der prozentuale Anteil an ILC in Bezug auf TLC vor und nach dem Sammeln bestimmt, um zu sehen wie hoch die prozentuale Abnahme der lebenden Legionellen durch den Sammelprozess ist. Waren vorher noch 89,7 % intakte Zellen vorhanden, sank der Wert nachher auf 76,1 %. Dadurch konnte gezeigt werden, dass 84,9 % der Legionellen den Sammelvorgang überleben.

Durch Wiederholung der Versuche ergaben sich für den Coriolis μ Überlebensraten von 75 - 90 %.

Diskussion

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass beide angesprochenen Systeme für Bioaerosole geeignet sind.

Mit dem CL-SMIA liegt innerhalb von 30 Minuten ein Ergebnis vor, ob in der Probe *L. pneumophila* Sg 1 enthalten ist und wenn ja welcher Subtyp vorliegt. Jedoch wurde dieser Assay bisher nicht quantitativ durchgeführt, sodass nur eine qualitative Betrachtung erfolgen kann.

Zur Konzentrationsbestimmung kann die Durchflusszytometrie mit der Methode von rqmicro angewandt werden, wobei innerhalb von 49 Minuten vier

Proben gleichzeitig vermessen werden können. Hierbei ist neben der spezifischen Analyse von *L. pneumophila* Sg 1-15 mit lebend/tot Unterscheidung auch eine Bestimmung der Gesamtzellzahl (total cell concentration (TCC)) möglich, was besonders bei Realproben von Interesse sein kann.

Da bei der Sammlung mit dem Coriolis μ immer ein Verdünnungsfaktor auftritt, müssen für beide Systeme weitere Untersuchungen in Bezug auf Nachweisgrenzen durchgeführt werden.

Bisher fanden alle Versuche unter definierten Bedingungen im Labor statt. Bei Realproben besteht immer die Herausforderung einer komplexeren Matrix und der Anwesenheit von Begleitbakterien, was zu Schwierigkeiten bei der Analyse von *L. pneumophila* führen kann.

Im weiteren Verlauf des Projekts sollen deshalb die entwickelten Sammel- und Analysestrategien für *L. pneumophila* in Aerosolen unter realen Bedingungen in Verdunstungskühlanlagen getestet werden, um eine passende Kombination aus Sammler und Analyseplattform zu etablieren.

Literatur

[1] MAISA, A. ; BROCKMANN, A. ; RENKEN, F. ; LUCK, C. ; PLEISCHL, S. ; EXNER, M. ; DANIELS-HAARDT, I. ; JURKE A.: Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013. In: *Euro Surveill* 20 (2015), pii=30064

[2] RICKETTS, KD. ; JOSEPH, C. ; LEE, J. ; WEWALKA, G.: European Working Group for Legionella Infections. Survey on legislation regarding wet cooling systems in European countries. In: *Euro Surveill* 13 (2008), pii=18982

[3] KIWULL, B. ; WUNDERLICH, A. ; HERR, C.E.W. ; NIESSNER, R. ; SEIDEL, M.: Bioaerosol chamber for Legionella containing shower aerosols. In: *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft*, 76 (2016), Nr. 9, S. 344-350